

La survie après la congélation à 195° au-dessous de zéro

B.-J. LUYET¹

Professeur de biologie, Université de Saint-Louis, Missouri, Etats-Unis

Dans une conférence à la Murithienne, en 1938², nous avons décrit une série d'expériences sur la survie de cellules, de tissus et d'organes, végétaux et animaux après congélation dans l'air ou l'azote liquide, à environ 195° au-dessous de zéro. A cette époque nous avons obtenu la survie de cellules d'épidermes de plantes, de feuilles de mousse, de fibres musculaires et de spermatozoaires de grenouilles.

Nous avons, depuis, réussi à raviver des animaux entiers, comme les anguillules du vinaigre, et à ramener à l'état d'activité des muscles à contractions rythmiques spontanées, tels que l'amnios et le cœur de l'embryon de poulet ; nous avons aussi pu maintenir intacts les globules rouges du sang congelé. C'est de ces recherches dont nous allons maintenant parler.

Pour comprendre la méthode employée dans nos expériences, il est nécessaire d'avoir une idée des principes de physique sur lesquels elles sont basées. Nous commencerons donc par exposer rapidement ces principes. (Le lecteur désireux d'avoir plus de détails à leur sujet les trouvera dans notre communication de 1938.)

Principes de physique sur lesquels les expériences de survie sont basées

Au point de vue de l'arrangement atomique ou moléculaire, la matière se présente sous deux états : l'état cristallin, dans lequel les atomes sont alignés en rangées régulières, et l'état amorphe (solide, liquide ou gazeux), dans lequel les molécules sont disposées au hasard.

¹ Conférence donnée à l'Assemblée de la Société Valaisanne des Sciences Naturelles « La Murithienne », à Binn, le 2 juillet 1950. Les expériences relatives à la reprise des battements de cœur et à la conservation des globules rouges du sang ont été décrites dans des conférences données, pendant l'été 1950, devant les sociétés de biologie de Lisbonne, d'Alger et de Paris, au centre des recherches scientifiques de Madrid, aux facultés des sciences ou de médecine de Palerme, Rome, Bordeaux et Fribourg (Brigau), ainsi qu'au congrès international de physiologie de Copenhague.

² B. LUYET, *Bull. Murithienne*, Vol. 56, p. 96, 1938-1939.

Lorsqu'on solidifie un liquide en le refroidissant, on le fait généralement passer de l'état amorphe à l'état cristallin, c'est-à-dire qu'on lui fait subir un réarrangement des molécules. Si l'on pouvait observer avec un microscope à grossissement suffisant la congélation de l'eau, à zéro, par exemple, on verrait les molécules se précipiter pour se mettre en rangs.

Ce remaniement moléculaire n'est possible que dans un intervalle de température compris entre zéro et quelques dizaines de degrés au-dessous de zéro, il ne peut pas se faire aux températures plus basses où les molécules sont, pour ainsi dire, engourdies. (Il faut savoir que, pour les physiciens, basse température signifie ralentissement ou engourdissement des molécules ; ainsi, un physicien qui voudrait parler en professionnel devrait, au lieu de dire de façon banale qu'il a froid, dire que les molécules de la surface de son corps ont ralenti leur mouvement... !)

On peut augmenter l'engourdissement des molécules d'un liquide en y dissolvant différentes substances qui en augmentent la viscosité : on peut, par exemple, retarder les mouvements moléculaires de l'eau en y dissolvant du sucre. L'addition de sucre ou, ce qui est équivalent, la diminution du pourcentage d'eau, facilite donc le passage à l'état amorphe.

Supposons maintenant qu'on refroidisse une solution aqueuse à une vitesse excessivement grande, de zéro à cinquante degrés au-dessous de zéro : on lui fait traverser l'intervalle de températures dans lequel les molécules sont encore suffisamment agiles, sans donner à ces molécules le temps de se mettre en rangs, c'est-à-dire, sans permettre à cette eau de former de la glace cristalline ; elle formera de la glace amorphe. En d'autres termes, les molécules ne subissent aucun déplacement ou dérangement dans le cours de la solidification, elles restent là où elles étaient à l'état liquide.

Il faut remarquer que le remaniement moléculaire qui accompagne la cristallisation peut se produire aussi bien pendant le réchauffement au travers de l'intervalle critique de températures que pendant le refroidissement. Il est donc nécessaire, non seulement de refroidir l'objet rapidement, mais aussi de le réchauffer rapidement, si l'on veut éviter la cristallisation.

Application du principe du refroidissement rapide à la survie

Lorsqu'on dit que les froids extrêmes tuent, on confond généralement deux questions : celle de l'action du froid seul et celle de l'action de la congélation en cristaux qui peut résulter du froid. Si le froid et la congélation à l'état amorphe sont un simple engourdissement des molécules, sans remaniement moléculaire, on ne voit pas bien pourquoi à eux seuls, ils entraîneraient la mort. Au contraire, on comprend sans peine qu'un dérangement des molécules, tel que celui occasionné par la cristallisation, disloque la structure délicate de la matière vivante et cause la mort.

Nous nous sommes donc demandé si, en prenant la précaution de refroidir et de réchauffer un organisme très rapidement au travers de l'intervalle de température dans lequel la glace cristalline se forme — c'est-à-dire de zéro à quelques dizaines de degrés au-dessous de zéro — on ne réussirait pas à le conserver en vie malgré la congélation. C'est précisément ce qui est arrivé et ce que nos recherches ont établi.

Comme la théorie le faisait prévoir, il est d'autant plus facile d'obtenir la survie que le contenu en eau de l'organisme est moins élevé. D'où l'avantage de déshydrater la substance vivante avant de la soumettre aux froids extrêmes.

Expériences sur la survie après congélation

En général, notre méthode d'expérimentation a consisté à : déposer l'objet à traiter sur une lame mince de verre ou de mica qui sert de support, immerger cette préparation dans un bain d'azote liquide pour la refroidir rapidement, l'immerger dans un bain à 30 ou 40° pour la réchauffer rapidement. Dans le cas des anguillules, de l'amnios et de l'embryon de poulet, nous avons, de plus, fait précéder le refroidissement par une déshydratation partielle, soit par un séjour prolongé dans une chambre à humidité réduite, soit par l'action d'une solution hypertonique de glycol.

Nous donnerons maintenant quelques détails sur chacun des organismes, organes, tissus ou cellules étudiés.

*Les anguillules du vinaigre*¹ Lorsqu'on examine un flacon de vinaigre devant une lampe ou à la lumière du soleil, on peut souvent

¹ P.-M. GEHENIO et B. LUYET, *Biodynamica*, Vol. 6, p. 141, 1947.

y observer une quantité de petits vers qui fourmillent à la surface : ce sont les « anguillules du vinaigre » (Nous avalons ces vers par milliers lorsque nous mangeons une salade, mais ils sont vraisemblablement tués dans notre estomac, car on n'a jamais remarqué qu'ils affectent l'organisme humain.)

On est surpris lorsqu'on observe ces animaux au microscope de leur vivacité et du fait qu'ils semblent ne jamais prendre de repos. En comparaison avec l'activité de nos muscles, c'est peut-être comme si nous essayions de faire exécuter à notre main un mouvement de va-et-vient — par exemple, si nous essayions de tracer avec un crayon sur une feuille de papier une ligne en zigzag à raison de cinq zigzags par seconde — et si nous continuions cette opération toute notre vie.

Un autre point non moins remarquable chez les vers du vinaigre est le peu de nourriture dont ils se contentent. Nous avons conservé pendant deux ans dans notre laboratoire un flacon contenant environ deux litres de vinaigre qui s'est maintenu très riche en anguillules, quoique nous n'ayions jamais ajouté de nourriture et que nous nous soyions assuré qu'il ne contenait point de « mère de vinaigre ».

Les anguillules semblaient toutes désignées pour nos expériences : leurs faibles dimensions rendaient possible le refroidissement rapide nécessaire pour prévenir la cristallisation et leur grande activité faisait espérer qu'elles fourniraient des signes de survie faciles à reconnaître.

L'expérimentation comportait les opérations suivantes : 1. Nous déposons une goutte de vinaigre très riche en anguillules sur une lame mince de mica placée sur la platine d'un microscope à faible grossissement. 2. Nous enlevons avec un morceau de papier buvard coupé en pointe tout le vinaigre de la goutte et ne laissons sur la plaque de mica que les anguillules, ramassées en un tas au centre. 3. Cette préparation était placée sur une plateforme dans une boîte en verre (boîte de Pétri) dont le couvercle ne fermait pas parfaitement et qui contenait un peu d'eau ; les anguillules subissaient ainsi une déshydratation légère dans une atmosphère à humidité réduite. La préparation restait dans cette chambre semi-humide pendant 24 heures. 4. Elle était alors immergée dans de l'azote liquide où elle demeurait pendant des temps variant de une minute à un jour. 5. Finalement elle était retirée de son bain refroidissant et immergée rapidement dans un bain de vinaigre stérilisé ou d'eau, à environ 30°, contenu dans un verre de montre. 6. Le

verre de montre était placé sous le microscope où nous observions ce qui se passait.

Les organismes étaient généralement immobiles pendant une ou deux minutes. Ensuite plusieurs commençaient à mouvoir lentement leurs extrémités. Petit à petit le mouvement s'étendait au corps entier de l'animal, mais il consistait en contorsions lentes et difficiles, comme si le corps avait de la peine à sortir de l'état d'engourdissement où il avait été. Ce n'est qu'au bout d'une ou deux heures qu'on voyait des anguillules se mouvoir avec aisance et à un rythme à peu près normal. La proportion de survivants a atteint, dans nos expériences les mieux réussies, environ 90 pour cent.

Muscle amniotique du poulet ¹. L'amnios est une membrane très mince qui se forme au cours du développement embryonnaire. Elle constitue un sac rempli d'un liquide dans lequel baigne l'embryon. Si on retire de l'œuf un embryon de 10 à 15 jours, avec le sac amniotique qui le contient, et qu'on dépose le tout sur une plaque de verre, on peut voir ce sac se contracter et se distendre rythmiquement, plusieurs fois par minute. Les histologistes ont trouvé que les parois du sac contiennent des fibres musculaires sans connexions nerveuses.

Comme nous sommes à l'affût de tout matériel vivant qui se présente sous forme de couche mince et qui est animé de mouvement permettant d'observer la survie, nous avons de suite jeté notre dévolu sur la membrane amniotique.

Des morceaux mesurant environ un centimètre carré, découpés dans la paroi du sac amniotique d'un embryon de 10 à 15 jours, étaient ensuite déposés sur des lamelles minces de mica et immergés successivement dans l'azote liquide et dans un bain de solution physiologique à 40°.

Après ce traitement les morceaux d'amnios restaient inertes pendant une heure ou deux. Alors plusieurs d'entre eux reprenaient leurs contractions, soit spontanément, soit après une première excitation que nous produisions en touchant le morceau de membrane avec une baguette de verre. Une fois les contractions déclenchées, elles se maintenaient d'elles-mêmes pendant 5 ou 10 minutes. La contractibilité, c'est-à-dire l'aptitude à répondre au contact par une contraction, était souvent conservée pendant plus d'une heure.

¹ B. LUYET et F. GONZALES, *Comptes rendus de l'Acad. des Sc.*, Vol. 230, p. 2331, 1950 (séance du 26 juin).

*Le cœur de l'embryon de poulet*¹. Après deux jours d'incubation, l'œuf de poule contient un embryon dont le cœur a commencé à battre. Cet embryon mesure environ 5 millimètres de long et il a moins d'un millimètre d'épaisseur. Le cœur, encore très incomplètement développé, a la forme d'un tube légèrement renflé ; on le voit très bien battre au microscope.

La préparation et le traitement de l'embryon comportaient les opérations suivantes : 1. Ouvrir l'œuf, enlever la membrane qui entoure le blanc, et découper avec des ciseaux à dissection les couches membranueuses qui maintiennent l'embryon appliqué sur le jaune. 2. Prélever l'embryon ainsi isolé en le tirant avec des pincettes sur une lamelle mince de mica. 3. Déshydrater légèrement l'embryon, d'abord au moyen de quelques gouttes de glycol, et ensuite en l'exposant quelques instants à l'air. 4. Le congeler par immersion dans l'azote liquide et le dégeler par immersion dans une solution de Tyrode à 40°.

Le cœur de l'embryon ainsi traité est sans mouvement pendant quelques minutes, puis on voit apparaître des contractions périodiques très faibles en un point seulement du tube cardiaque. Ces contractions vont généralement en s'accroissant pendant 10 à 15 minutes et elles s'étendent lentement aux régions avoisinantes ; elles peuvent se maintenir pendant plusieurs heures ; une fois elles se sont maintenues pendant vingt heures. L'intensité des contractions n'est jamais égale à celle des embryons témoins isolés mais non congelés ; le rythme et la fréquence sont souvent modifiés mais d'une façon que nous n'avons pas encore pu analyser.

*Cellules rouges du sang*². On emploie souvent, dans les laboratoires, la méthode de congélation pour démontrer l'hémolyse, c'est-à-dire le phénomène d'après lequel l'hémoglobine ou substance qui donne au sang sa couleur rouge, s'échappe des globules et se dissout dans le plasma lorsque les globules sont endommagés. Le gel endommage donc ou détruit le globules. Le sang normal, en bon état de conservation, est opaque (ou translucide), parce que ses globules dispersent la lumière ; au contraire le sang hémolysé est transparent (comme de l'encre rouge) parce que ses globules sont détruits et que leur hémoglobine est dissoute dans le plasma ; on peut lire un texte à travers une couche de 1 cm. de sang hémolysé.

¹ F. GONZALES et B. LUYET, *Biodynamica*, Vol. 7, p. 1, 1950.

² B. Luyet, *Biodynamica*, vol. 7, p. 217, 1949.

Or, contrairement à ce qui se passe dans le cas de la congélation lente à quelques degrés au-dessous de zéro, nous avons trouvé que le sang gelé rapidement à la température de 195^0 au-dessous de zéro et réchauffé rapidement n'est pas hémolysé.

Notre technique était la suivante : nous étendions une goutte de sang de bœuf sur une lamelle mince de verre ou de mica et immergions cette préparation dans l'azote liquide. Nous la transportions ensuite dans une petite quantité de solution physiologique à 40^0 où le sang fondait rapidement et où les globules se dispersaient. L'observation de la transparence ou de l'opacité de la solution, ou le compte des globules au microscope, ou leur séparation à la centrifugeuse nous permettait de nous rendre compte des résultats.

Il est à remarquer que des quatre façons possibles de faire cette expérience, c'est-à-dire :

1. Avec refroidissement rapide et réchauffement rapide,
2. Avec refroidissement rapide et réchauffement lent,
3. Avec refroidissement lent et réchauffement rapide,
4. Avec refroidissement lent et réchauffement lent,

la seule qui permettait la préservation des globules était la première. Ces résultats cadrent bien avec les prévisions qu'un séjour prolongé aux températures de cristallisation, soit pendant le refroidissement, soit pendant le réchauffement, est fatal.

Remarques diverses

1. Nous n'avons vraisemblablement jamais obtenu le rétablissement complet de l'état normal après la congélation. Les mouvements observés étaient ou moins intenses ou moins aisés que chez les témoins ; leur durée était généralement réduite ; la proportion de survivants n'était pas toujours élevée. On doit probablement attribuer ces résultats à l'impossibilité d'éviter complètement la cristallisation, le refroidissement et le réchauffement n'étant pas suffisamment rapides pour empêcher la formation de minuscules noyaux cristallins.

2. On nous demande souvent si notre procédé pour obtenir la survie n'est pas le même que celui du refroidissement rapide que l'on emploie de plus en plus dans l'industrie du froid pour préserver les aliments. Oui et non. Dans l'industrie, on se propose, par un refroidissement de *quelques degrés par minute* d'empêcher la formation de gros cristaux de glace qui sépareraient l'eau des tissus et altéreraient

leur goût ; dans nos expériences de survie, nous essayons, par un refroidissement de *quelques centaines de degrés par seconde*, d'éviter toute formation de cristaux et de maintenir l'organisme ou le tissu en vie. L'emploi de notre méthode dans l'industrie frigorifique demanderait qu'on fasse congeler un animal sans le tuer, qu'on le conserve vivant au « frigo » et qu'on le fasse dégeler pour le tuer au moment où on voudrait en avoir la viande. Cela est évidemment impossible à l'heure actuelle, car nous ne connaissons aucun moyen de refroidir à une vitesse de plusieurs centaines de degrés par seconde des masses de plus d'une fraction de millimètre d'épaisseur.

3. Les vitesses dont nous parlons ne sont pas que des approximations. Elles sont mesurées sur des courbes de refroidissement enregistrées photographiquement. Pour cela un thermomètre qui mesure environ un dixième de millimètre d'épaisseur (la soudure d'un couple thermoélectrique) est inséré dans l'objet à étudier, par exemple, l'embryon de poulet. Quand celui-ci est immergé dans le bain refroidissant, l'abaissement de température produit un courant électrique dans le thermomètre. Ce courant très faible est amplifié et introduit dans le circuit d'un oscillographe à rayons cathodiques (l'appareil employé en télévision) sur l'écran duquel il dessine une courbe qui indique le nombre de degrés parcourus par le thermomètre chaque centième de seconde. Cette courbe est photographiée et on peut alors l'étudier à loisir.

Résumé

L'emploi de la méthode de refroidissement et de réchauffement ultra-rapide (200 degrés par seconde) nous a permis d'obtenir : 1. la survie des anguillules du vinaigre, 2. la reprise des battements de cœur chez l'embryon de poulet, 3. la reprise des contractions rythmiques spontanées du muscle amniotique, 4. la conservation des globules rouges du sang, après que ces organismes, organes ou cellules avaient été congelés à 195° au-dessous de zéro. Ces résultats sont en accord avec la théorie qui a inspiré nos recherches, d'après laquelle la formation de glace cristalline détruit la structure de la matière vivante, tandis que le froid seul et la solidification à l'état amorphe ne l'endommagent pas.